



**Skræddersyede proteiner
uden naturens begrænsninger**

Strømgaard, Kristian; Jensen, Mette Stougaard; Kristensen, Anders Skov

Published in:
Lægemedelforskning

Publication date:
2009

Document version
Også kaldet Forlagets PDF

Citation for published version (APA):
Strømgaard, K., Jensen, M. S., & Kristensen, A. S. (2009). Skræddersyede proteiner: uden naturens begrænsninger. *Lægemedelforskning*, 10-12.

Skræddersyede proteiner

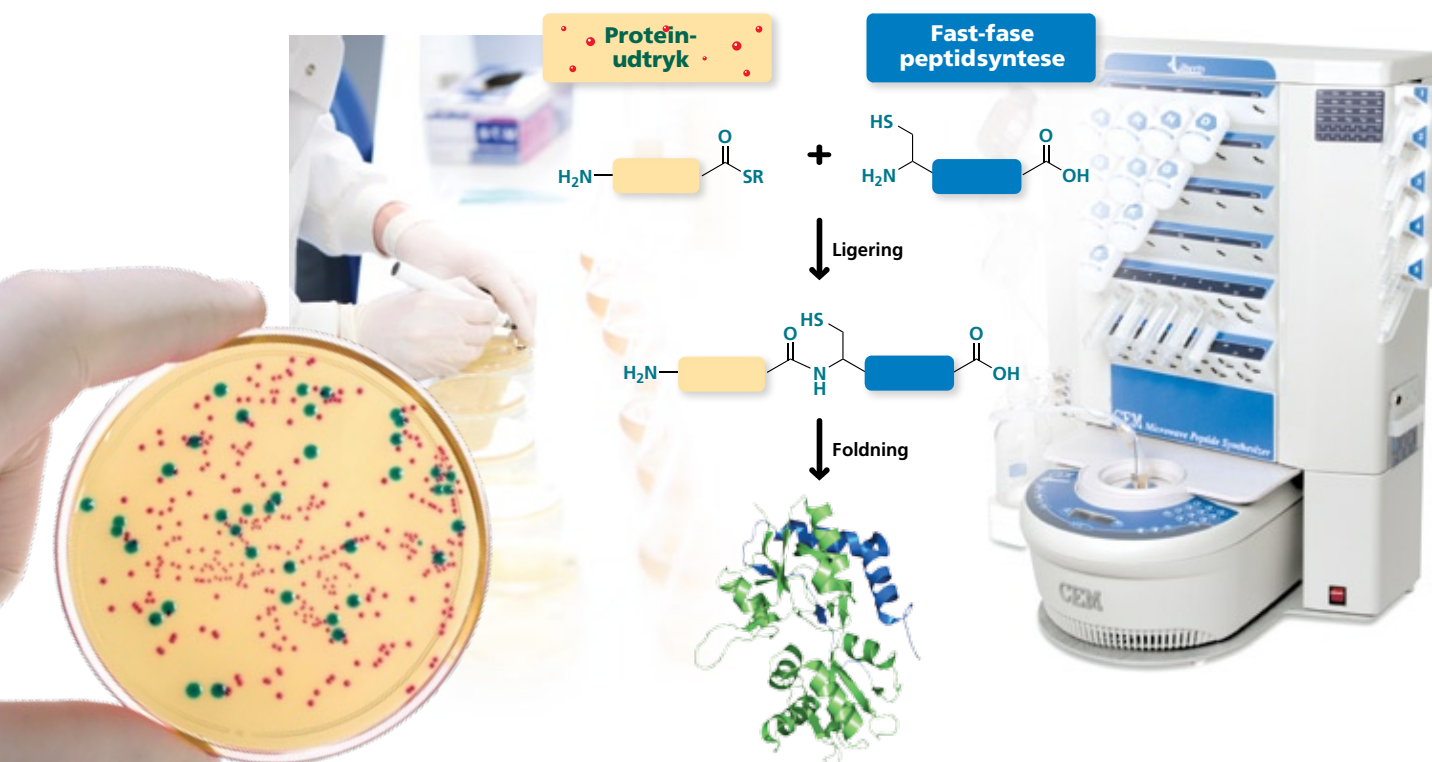
– uden naturens begrænsninger

Ved at kombinere biologiske og kemiske metoder kan man nu designe semi-syntetiske proteiner stort set uden hensyn til de begrænsninger, som findes i naturen. Vi har fremstillet dele af en receptor i hjernen, som kan give ny indsigt i receptorens funktion. Samtidig åbner teknologien op for udvikling af nye proteinlægemidler med forbedrede egenskaber.

Af Kristian Strømgaard, Mette S. Jensen og
Anders S. Kristensen

Proteiner er kroppens vigtigste byggeklodser og arbejdsheste. Nogle proteiner er enzymer, som udfører biokemiske funktioner såsom fordøjelse og optagelse af næring, andre proteiner er antistoffer, som bekæmper bakterier og virus, mens nervesystemets receptorproteiner spiller en central rolle for bearbejdelse af sanseindtryk og for signalprocesserne i hjernen.

På grund af deres enorme betydning er proteiner det altoverskyggende biologiske mål for lægemidler. De fleste lægemidler virker ved at binde sig til et eller flere af kroppens proteiner; især receptorer eller enzymer. Detaljeret viden om disse proteins struktur og funktion er således uhyre vigtig i bestræbelserne på at udvikle nye og bedre lægemidler. Traditionelt har man i medicinsk forskning fremstillet grupper af stoffer og testet deres biologiske effekt på receptorer, og på den måde har man opnået viden om sammenhængen mellem lægemiddelstoffernes struktur og deres biologiske virkning. Men metoden giver kun indirekte viden om selve proteinets struktur og funktion. Derfor er der stor interesse i at kunne overføre teknikkerne og principperne fra medicinsk forskning til proteinernes verden, hvilket er målet for en ny disciplin, som kaldes protein-medicinsk kemi. Her har man mulighed for frit at ændre i proteins struktur og efterfølgende observere den biologiske effekt af ændringen.

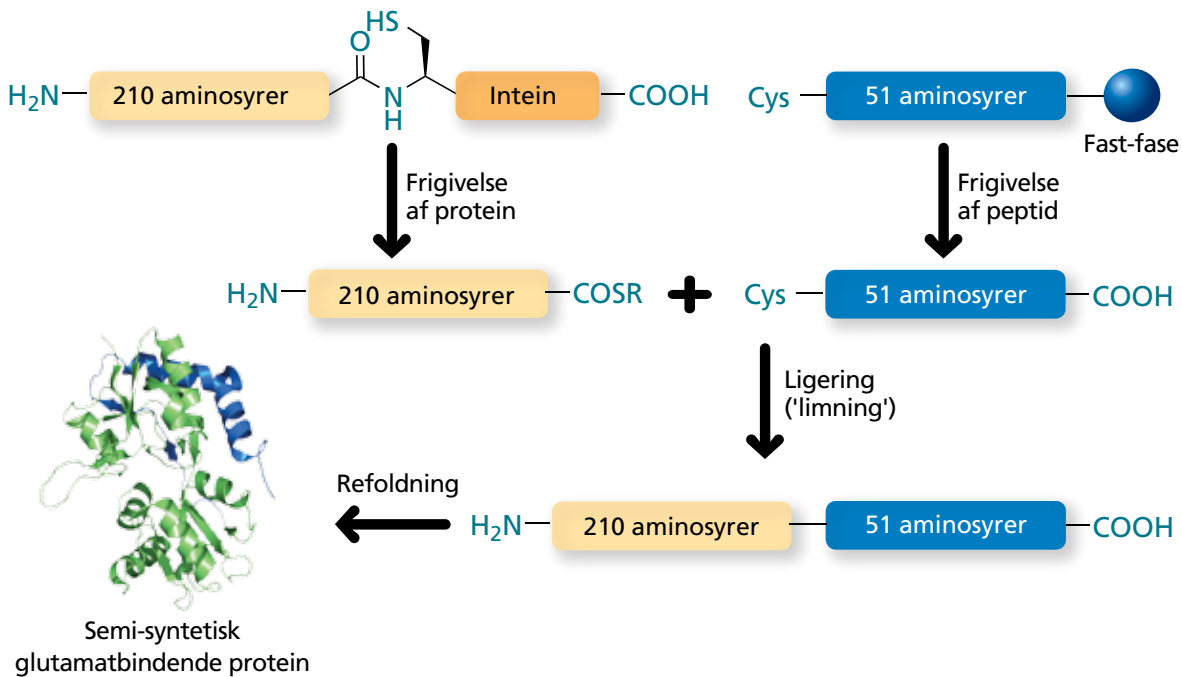


Semi-syntese kombinerer genetisk fremstilling af proteiner (tv.) med fast-fase peptidsyntese (th.). Først skal de to komponenter, protein og peptid, fremstilles, så de udstyres med komplementære kemiske grupper, der muliggør, at fragmenterne kan sættes sammen som byggeklodser. Dernæst skal proteinet og peptidet "limes" sammen, hvorved det semi-syntetiske protein dannes.



PROTEINFREMSTILLING I E. COLI

PEPTIDSYNTESE



Vi har fremstillet den glutamatbindende del af en glutamatreceptor ved hjælp af semi-syntese. Receptorproteinet består af 261 aminosyrer. Først fik vi udtrykt et inaktivt forstadium af proteinet i E. coli. Forstadiet, som indeholder 210 aminosyrer, blev efterfølgende aktiveret ved at frigøre den kemiske gruppe, der er væsentlig for, at ligering ('limning') kan finde sted. Sideløbende fremstillede vi et peptid med 51 aminosyrer ved brug af fase-fase peptidsyntese og lignede dette til den bakterielt udtrykte byggeklod, hvorpå det ønskede protein var sat sammen. Det biologisk aktive protein blev til sidst dannet ved refoldning, hvorefter biologiske undersøgelser bekræftede, at det semi-syntetiske protein opførte sig som det normale protein.

Kombination af kemi og biologi

Proteiner er opbygget af aminosyrer, som er sat sammen i kæder – såkaldte polypeptider. I alle organismer fra bakterier til mennesker er der præcis 20 forskellige aminosyrer til rådighed som byggesten for proteinerne. Opskriften på, hvilke aminosyrer et protein skal indeholde, og i hvilken rækkefølge de skal sættes sammen, er givet i vores gener. Mennesket har mere end 20.000 gener, og kroppen indeholder et lignende antal forskellige proteiner.

I laboratoriet har man traditionelt kunnet fremstille menneskelige proteiner med to metoder. Den første metode er biologisk, hvor man ved hjælp af genteknologi isolerer genet for det ønskede protein fra menneskeceller og introducerer genet i encellede organismer som bakterier og gær eller i pattedyrsceller. Her aktiveres cellen til at producere det ønskede protein fra det udefrakommende gen. Da celler kan dyrkes i flydende kulturer i litervis, kan man efterfølgende isolere store mængder af proteinet. Alternativt kan man fremstille et protein ved en kemisk teknik, som kaldes fast-fase peptidsyntese, hvor proteinernes byggesten – aminosyrerne – hæftes sammen en for en, indtil det ønskede protein er dannet. Hver teknologi har sine fordele og ulemper. Produktion af proteiner i bakterier og gær kan relativt nemt opskaleres til industriel skala, men genteknologien er begrænset til bru-

gen af de 20 aminosyrer, som generne koder for. Modsat er fast-fase peptidsyntese ikke begrænset til de 20 aminosyrer, men metoden er til gengæld bekostelig og kan generelt kun benyttes til at fremstille små proteiner, som indeholder op til 60 aminosyrer. Det er en væsentlig begrænsning, fordi hovedparten af kroppens proteiner består af mange flere aminosyrer.

For at kunne praktisere protein-medicinkemi er det nødvendigt, at man – som i medicinkemien – har mulighed for frit at variere proteiner uden at være begrænset til naturens 20 aminosyrer eller af proteinets størrelse. Denne frihed kan opnås med en semi-syntetisk teknologi, som kombinerer de biologiske og de kemiske metoder. I denne teknologi fremstilles en del af proteinet i bakterier eller gær, mens den resterende del fremstilles ved hjælp af fast-fase peptidsyntese. Efterfølgende "limes" de to dele sammen, så de danner det endelige protein. Teknologien kræver først og fremmest, at de to byggeblokke hver især udstyres med komplementære kemiske grupper, som muliggør, at de kan limes sammen. Den helt store fordel ved metoden er, at man i den kemisk fremstillede del af proteinet kan introducere hvilken som helst syntetisk aminosyre, hvilket udvider valgmulighederne fra 20 til flere end 1000 forskellige aminosyrer som byggesten.

FORBEDREDE PROTEINLÆGEMIDLER

Den semi-syntetiske teknologi har stor bevågenhed i forhold til at kunne lave modificerede terapeutiske proteiner. Proteiner kan nemlig være lægemidler i sig selv; nogle eksempler er insulin til behandling af sukkersyge, væksthormon til behandling af dværgvækst og erythropoietin (EPO) til behandling af blodmangel.

Terapeutiske proteiner er et område i hastig vækst, men en afgørende udfordring i udviklingen er, at de anvendte proteiner ofte er ustabile i kroppen. Det medfører, at proteinet ikke kan indtages som tabletter, fordi det vil blive fordøjet i mave og tarm, og derfor må indgives som injektioner. Ydermere er det problematisk, at proteinet på trods af direkte injektion i blodbanen ofte mister sin effekt på grund af nedbrydning. Derfor er man uhyre interesseret i at modificere proteiner, så man øger både stabiliteten og effekten, og her har den semi-syntetiske teknologi et stort potentiale.

Semi-syntese af en glutamat receptor

Den nye semi-syntetiske teknologi har en lang række anvendelsesmuligheder. Først og fremmest i grundforskning, hvor teknologien kan benyttes i undersøgelser af sammenhængen mellem proteiners struktur og deres funktion, idet teknologien tillader, at man kan i stedet for kun at kunne indføre 20 forskellige modifikationer i proteinet nu i princippet kan vælge mellem flere tusinde

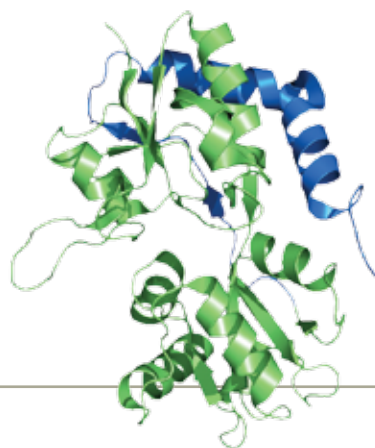
Et eksempel fra Kemisk Biologi gruppen på Institut for Medicinalkemi er studiet af receptorerne for hjernens primære stimulerende signalstof glutamat. Glutamatreceptorerne er en af de vigtigste grupper af receptorer i hjernen, da de findes i cellemembranerne på omtrent alle nerveceller og spiller en afgørende rolle for hukommelse og indlæring samt for mange hjernesygdomme såsom Alzheimers sygdom og skizofreni.

Glutamatreceptorer er opbygget af fire proteiner, som tilsammen danner receptoren. Hvert af disse proteiner er opdelt i fire domæner, og her er det lykkedes at isolere og producere det protein-domæne, hvortil glutamat binder, som en separat enhed. Domænet består af 261 aminosyrer, og det har været benyttet til en lang række vigtige studier af sammenhængen mellem glutamats binding og receptorfunktion samt til undersøgelser af, hvordan en række mulige lægemiddelstoffer binder sig til glutamatreceptorerne.

Vort mål var at fremstille det glutamatbindende domæne ved hjælp af semi-syntese for at kunne fortage detaljerede protein-medicinalkemiske studier af glutamatreceptoren. Første trin i processen var at identificere positioner i proteinets aminosyrekæde, som tillod, at to proteindele kunne limes sammen ved en proces kaldet ligering. Vi identificerede et muligt ligeringssted, som tillod os at dele proteinet i et stort fragment med 210 aminosyrer og et mindre fragment med 51 aminosyrer. Det store fragment krævede fremstilling i bakteriekulturer, mens det lille kunne fremstilles ved fast-fase peptidsyntese.

Dernæst skulle de to komponenter sættes sammen ved hjælp af kemisk ligering. Under dette trin er en af de meget store udfordringer, at de komplementære kemiske grupper, som muliggør ligeringen, er ustabile. Derfor er det vigtigt at finde de helt rette betingelser for, at ligeringen kan finde sted. Efter at disse betingelser var bestemt og optimeret, lykkedes det at danne proteinet med 261 aminosyrer. Efterfølgende udførte vi en række biologiske undersøgelser på proteinet, som viste, at det semi-syntetiske protein opførte sig som det normalt fremstillede protein.

På nuværende tidspunkt har vi således udviklet en metode, som muliggør fremstilling af det glutamatbindende domæne semi-syntetisk. I øjeblikket benytter vi metoden til at introducere en række modifikationer i proteinet. Fx undersøger vi, hvilken rolle kemiske grupper i proteinets rygrad har for binding af glutamat. Disse amidgrupper kan kun modificeres ved hjælp af semi-syntetisk teknologi, hvilket vi har udnyttet til at erstatte udvalgte amidgrupper med estergrupper. På den baggrund kan vi undersøge betydningen af hver enkelt amidgruppe for binding af glutamat samt mulige lægemiddelstoffer. Det åbner op for en større forståelse for sammenhængen mellem struktur og funktion af receptoren og dermed for design af nye og bedre lægemiddelstoffer.



Ph.d. Kristian Strømgaard er professor på Institut for Medicinalkemi
Cand.polyt. Mette S. Jensen er ph.d.-studerende på Institut for Medicinalkemi
Ph.d. Anders S. Kristensen er lektor på Institut for Medicinalkemi